

# イネ葉の高CO<sub>2</sub>濃度条件下における光合成の律速因子に関する研究-Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/OxygenaseとCytochrome fの量的関係からの解析-

著者	日出間 純
号	462
発行年	1992
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16463">http://hdl.handle.net/10097/16463</a>

氏 名(本籍)	ひ で ま 日 出 間	じゅん 純
学 位 の 種 類	博 士	(農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第	4 6 2 号
学位授与年月日	平 成 5 年 3 月 25 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程)	農芸化学専攻
学 位 論 文 題 目	イネ葉の高 CO <sub>2</sub> 濃度条件下における光合 成の律速因子に関する研究 — Ribulose-1, 5-bisphosphate Carboxylase /Oxygenase と Cytochrome f の量的関係 からの解析—	
論 文 審 査 委 員 (主 査)	教 授	小 島 邦 彦
	教 授	伊 崎 和 夫
	教 授	折 谷 隆 之
	助教授	前 忠 彦

# 論文内容要旨

## 序

C<sub>3</sub>型植物の単葉の光合成能力は、その機能の面から次の3つの能力より成ると考えられている。①Chlorophyll 等の光合成色素により光エネルギーを吸収する集光能力。②吸収した光エネルギーを利用し電子伝達反応によりATP、NADPHを合成する電子伝達能力。③電子伝達反応から供給されるATP、NADPHを利用して、葉緑体内に拡散してくるCO<sub>2</sub>を固定する炭酸固定能力。植物は、これら3つの能力の密接な相互作用の下に光合成を行っていると考えられる (Fig. 1 参照)。

近年、単葉の光合成の律速因子に関する研究が進み、炭酸固定酵素であるribulose-1, 5-bisphosphate (RuBP) carboxylase / oxygenase (以下 Rubisco) が、光飽和、大気CO<sub>2</sub> 濃度条件下における光合成速度の律速因子であることが明らかになった。しかし、CO<sub>2</sub>濃度が大気のそれより高い領域ではRubisco 以外の因子により律速されていることが、イネを含むいくつかの植物で調べられてきている。

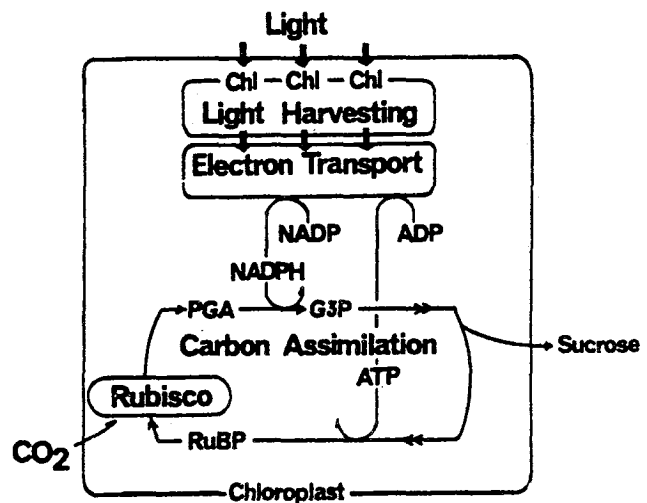


Fig. 1. Simplified Photosynthetic Mechanisms in C<sub>3</sub> Species.

Fig. 2には、葉内でのCO<sub>2</sub>分圧 (C<sub>i</sub>) の変化に対する光飽和条件下での光合成速度の変化 (黒丸実線) をガス交換同化箱法によりイネ葉を用いて測定した結果と、イネRubiscoの酵素量とその kinetic parameters (補章1、参照) を用いて葉内 CO<sub>2</sub>分圧で算出されるRubisco 活性 (点線) との関係を示した。C<sub>i</sub>がおよそ350 μbar以下で実測された光合成速度は、算出されたRubisco 活性ときわめてよく一致している。一方、C<sub>i</sub>がおよそ350 μbar以上の葉内 CO<sub>2</sub>分圧条件下で実測された光合成速度は、算出されたRubisco 活性を大きく下回り、この領域での光合成速度が、Rubiscoの量とその酵素的性質によって律速されないことがわかる。

しかし、この高CO<sub>2</sub>濃度下での光合成速度を律速する因子が具体的に何であるかについての解析例は数多くあるものの、未だ明確な結論を得るに至っていない。また、イネについて詳細に研究した例はみられない。近年、地球をとりまくCO<sub>2</sub>ガスの濃度は、過去に例のない速度で急上昇している。それゆえ、社会的にも高CO<sub>2</sub>濃度下での光合成の機作を解明することは、とりわけ重要なこととなっている。

本研究では、世界三大主要作物の一つであるイネを材料に、高CO<sub>2</sub>濃度条件下での光合成速度の律速因子を探ることを目的とした。本論に入る前に、光飽和、高CO<sub>2</sub>濃度条件下での光合成速度を律速する可能性のある因子について考えてみた。

この光飽和、高CO<sub>2</sub>濃度下での光合成速度が一定となる要因としては、葉内に高い濃度で存在するCO<sub>2</sub>に対して、Rubiscoのもう1つの基質であるRuBPの供給が律速になっていることがあげられる (Fig. 1参照)。RuBPは炭酸固定回路により、電子伝達から供給されるATP、NADPHを利用して再生産される。それゆえ、高CO<sub>2</sub>濃度下での光合成速度は、RuBP再生産速度に関連した因子により律速されている可能性が考えられる。そこで、このRuBPの再生産に最も深く関与していることが多くの研究者によっても指摘される、電子伝達能力に着目した。そして特に、電子伝達能力を構成する因子の中でも、その最大活性と因子の量との間にきわめて高い相関関係が見られることで知られるCytochrome f (Cyt f) に的を絞ることにした。

本研究では、Cyt f 量が光飽和、高CO<sub>2</sub>濃度条件下での光合成速度を律速する因子であるか否かについて、正常なイネの一般栽培種 (ササニシキ) と、Chlorophyll (Chl) 含量が顕著に少なく、Cyt f 含量も特に少ないことが期待されたイネ

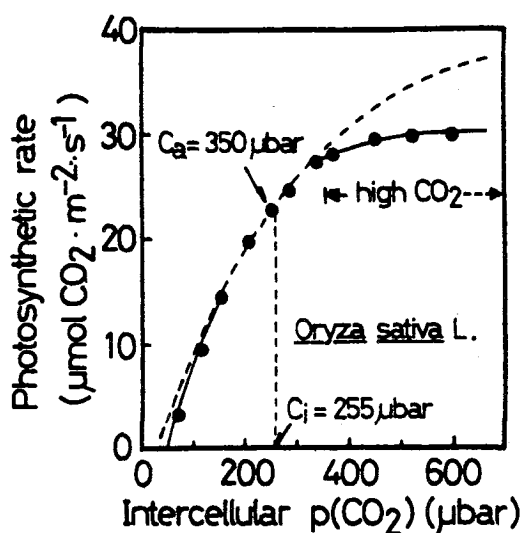


Fig. 2. Response of the photosynthetic rate ( $P$ ) to the intercellular CO<sub>2</sub> pressure ( $C_i$ ) in the rice leaf. Measurements were made at a leaf temperature of 25°C and an irradiance of 1800  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The arrows indicate the point obtained at an ambient CO<sub>2</sub> pressure ( $C_a$ ) of 350  $\mu\text{bar}$  and  $C_i$  of 255  $\mu\text{bar}$  at  $C_a$ . The dashed curve was fitted to the photosynthetic rate using the equation 3 in Appendix I for the rice-Rubisco kinetics.

の黄色変異種（オウショクカメノオ）の2品種を材料に、解析を行った。イネの黄色変異種については Teraoらが、チラコイドを構成する種々なタンパク質にかなり量的変異があることを報告している。もし、この黄色変異種においてCyt f 量にも変異が見つかれば、高CO<sub>2</sub>濃度下での光合成速度とCyt f 量との関係に関して、より明確な結論が得られると考えた。まず両品種におけるRubisco およびCyt f 含量の量的関係について調べた。その結果、黄色変異種は一般栽培種に比べ、Rubisco 当りのCyt f 含量が少ないことがわかったので、次にこれら2品種を用いて、高CO<sub>2</sub> 濃度条件下における光飽和での光合成速度と、Rubisco およびCyt f との量的関係について調べた。

## 第1章 黄色変異種と一般栽培種における、Rubisco とCyt f 含量の量的関係

本章では、一般栽培種ササニシキを比較の対照に、黄色変異種のCyt f 含量に変異があるか否かを調べた。イネ一般栽培種（ササニシキ）と黄色変異種（オウショクカメノオ）を水耕法により栽培した。第11葉出葉後、窒素濃度として3段階（0.2, 2.0, 10 mM N）の区を設け、2週間栄養処理をした後の完全展開葉を実験に用いた。

**Chlorophyll 含量** 黄色変異種のChl 含量は、一般栽培種のおよそ1/3 程度と少ない。特に集光機能としての重要な役割を担う光化学系IIクロロフィルタンパク質複合体（LHC II）含量は、一般栽培種に比べ 1/4程度しかなく、集光能力が明らかに劣っていることが予想された。

**Rubisco 含量、NADP-G3P-DH 活性、Cyt f 含量** まずCyt f の定量法について、2品種間の量的な比較が可能であるかを次に述べる2つの方法により検討した。Cyt f の酸化型と還元型の553.5 nm吸光度差スペクトルから、差吸光係数を用いて

Table 1. Relative amount of Cyt f determined between western-blotting using monospecific antiserum against Cyt f and hydroquinol-reduced minus ferricyanide-oxidised difference spectra

	Normal rice	Yellowish rice
Relative Cyt f amount	100 ± 3	104 ± 4

タンパク量を推定する方法と、Cyt f の特異抗体を用いたWestern-blotting法である。両品種のCyt f 含量をそれぞれの方法を用いて定量したところ、定量法の違いによる有意な品種間差は認められず、2品種間の量的比較が可能であることが分かった(Table 1)。そこでCyt f の定量には、Western-blotting法よりも定量誤差がより少ないCyt f の酸化型—還元型吸光度差スペクトル法を用いた。Rubiscoタンパク量は、SDSポリアクリルアミド電気泳動法により定量した。また、RuBP再生産反応に関係した因子の1つであるNADP-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP-G3P-DH) の活性も同時に測定した。両品種において、葉面積当りの葉身窒素含量に対するRubisco含量、NADP-G3P-DHの活性に差はみられなかった(Fig. 3)。しかし、Cyt f 含量は黄色変異種の方が明らかに少なく、一般栽培種のおよそ70%程度であることがわかった。このことから、黄色変異種は一般栽培種に比べて、Chl含量が少ないだけでなく、Rubiscoに対するCyt f 含量も少ないことがわかった(Fig. 3)。

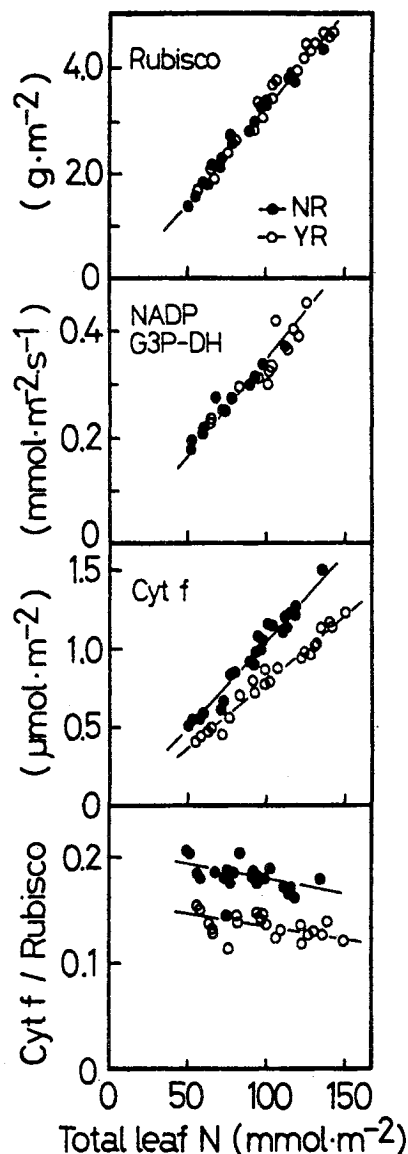


Fig. 3. Rubisco content, NADP-G3P-DH activity, Cyt f content and the ratio of Cyt f content to Rubisco content in the leaves of normal (●) and yellowish (○) rices versus total leaf-nitrogen.

## 第2章 光飽和、高CO<sub>2</sub>濃度条件下における光合成速度とCyt f との量的関係

第1章の結果から、黄色変異種は一般栽培種に比べてRubisco に対するCyt f 含量が少ないことが明らかとなった。しかし、この黄色変異種は、Chl含量が少ないため、光の利用能が一般栽培種に比べ劣っている。このことから、黄色変異種の光飽和に達する光強度は、一般栽培種よりも高いことが考えられた。本章では、光飽和、高CO<sub>2</sub>濃度条件下における最大光合成速度の律速因子を解明するため、まずこれら2品種の光飽和点について調べることにした。そして次に、これら2品種を用いて、光飽和、高CO<sub>2</sub>濃度条件下での光合成速度とCyt f との量的関係について調べた。

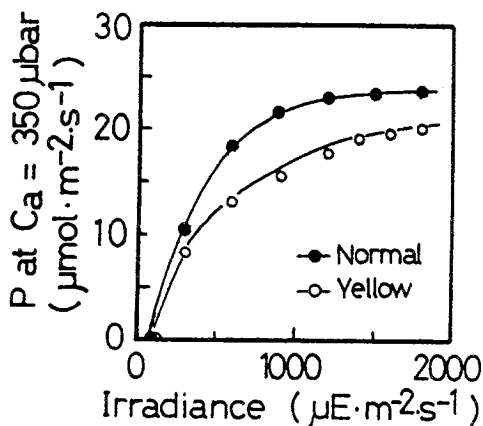


Fig. 4. Responses of the photosynthetic rate (P) to irradiance in normal (●) and yellowish (○) rice leaves. Measurements were made at a leaf temperature of 25°C and an ambient CO<sub>2</sub> pressure of 350 μbar.

**光飽和点の解析** 両品種の光飽和条件について検討するため、光強度と光合成速度との関係を調べた。光合成速度はガス交換同化箱法により、葉温25°C、大気CO<sub>2</sub>分圧(350 μbar)条件に設定して測定した。Fig. 4には、ほぼ等しいRubisco 含量を有する2品種の葉について比較した結果を示した。一般栽培種では、およそ1500 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>の光強度において飽和状態に達していた。一方、黄色変異種では1800 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>(およそ真夏の昼間の直射日光に匹敵する光強度)においても、一般栽培種に比べ光合成速度も低く、明らかに光飽和に達していなかった。

既存の光合成速度測定装置における測定可能な光強度の機械的限界は、およそ2000 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>であるため、光飽和条件下において、高CO<sub>2</sub>濃度下の光合成速度を直接測定することは不可能であった。そこで、以下に述べる方法を用いて光飽和、高CO<sub>2</sub>条件下での最大光合成速度を算出することを試みた。

光飽和、高CO<sub>2</sub>濃度条件下における最大光合成速度 (P<sub>max</sub>)、および最大酸素発生速度の算出

光飽和、高CO<sub>2</sub>濃度条件下での最大光合成速度 (P<sub>max</sub>) を、補章のIIに示したThornleyの式を用いて算出することを試みた。方法としては、まずガス交換同化箱法を用いて、高CO<sub>2</sub>濃度下での光強度に対する光合成速度の変化を測定した。なお、葉内CO<sub>2</sub>分圧がおよそ600 μbar程度になるように、同化箱に送り込むCO<sub>2</sub>分圧を800 μbarに設定した。そして、得られたデータをThornleyの式に代入し、非直線双曲線近似プログラムソフトを用いてP<sub>max</sub>を算出した。また光

飽和、高CO<sub>2</sub>濃度条件下での電子伝達活性を推定するため、電子伝達反応の結果として発生する酸素の最大発生速度を算出した。方法としては、気相酸素電極法を用いて、高CO<sub>2</sub>濃度下での光強度に対する酸素発生速度のレスポンスを測定した。そして得られたデータから同様にThornleyの式を用いて、光飽和下での最大酸素発生速度を求めた。なお、この方法においては、CO<sub>2</sub>濃度を5%程度に行った。気相酸素電極法を用いて算出された最大酸素発生速度とCyt f 量と

の関係 Fig. 5には、光強度が1800 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>での酸素発生速度 (上パネル)、およびThornleyの式から算出された最大酸素発生速度 (下パネル) とCyt f 量との関係を示した。黄色変異種において光飽和条件でない光強度、1800 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>におけるCyt f 当りの酸素発生速度は、黄色変異種の方

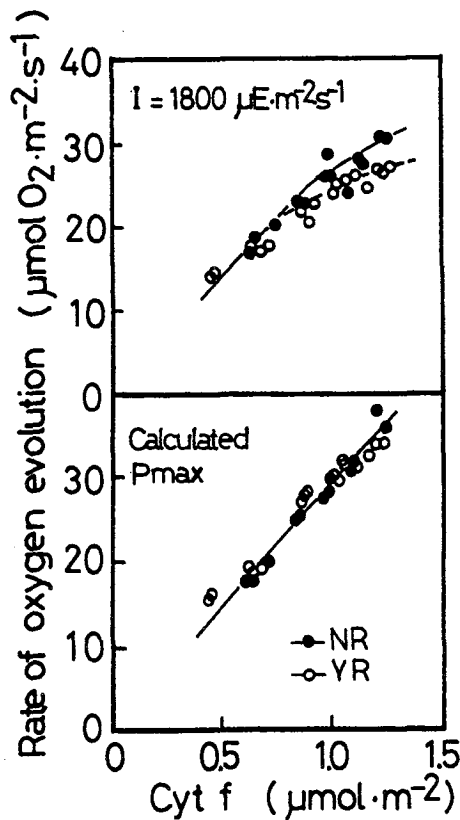


Fig. 5. Relationships between the Cyt f contents and the rates of oxygen evolution at an irradiance of 1800 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (upper panel) and the maximum rates of oxygen evolution calculated from Thornley's equation (Appendix II). Measurements were made at leaf temperature of 25°C, and saturating CO<sub>2</sub> concentration (~5%). Oxygen evolution was determined with a leaf disc oxygen electrode system. Symbols are the same as in Fig. 4.



が一般栽培種よりも低かった。しかし、両品種において算出された最大酸素発生速度は、Cyt f 量と原点を通る一本の直線上に回帰された。このことは、両品種において酸素発生速度から推定されるCyt f 当りの電子伝達活性に差がないことを意味した。また同時に、Cyt f 量が電子伝達活性の律速因子になり得ることを確認した。ガス交換同化箱法を用いて算出された最大光合成速度とRubisco、およびCyt f 量との関係 ガス交換同化箱法を用いて、光飽和、高CO<sub>2</sub>濃度条件下での光合成速度とRubisco、およびCyt f 量との関係を調べた。Rubiscoは、高CO<sub>2</sub>濃度下での光合成速度を律速する因子ではないにも関わらず（序章）、両者は一本のゆるやかな飽和曲線上に回帰された（Fig.6）。このことは、高CO<sub>2</sub>濃度下での最大光合成速度を律速する因子がRubisco と常に同じ割合で変化していることを意味した。一方、Cyt f 量は算出された最大光合成速度に対して、明らかに二本の異なる直線に回帰された（Fig. 7）。この結果は、Cyt f が、光飽和、高CO<sub>2</sub> 濃度条件下での最大光合成速度を律速する因子でないこと示した。

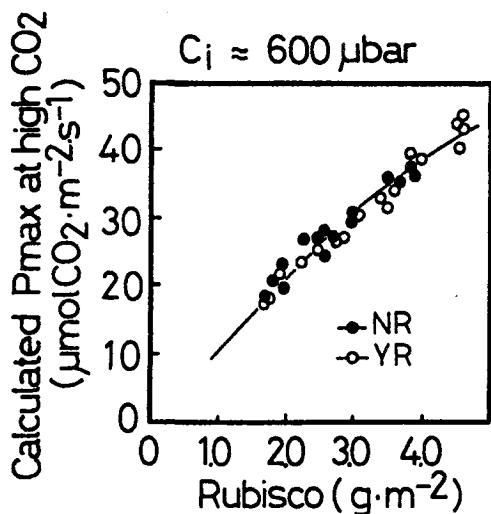


Fig. 6. Relationship between the maximum rate of photosynthesis ( $P_{max}$ ) at  $C_i \approx 600 \mu\text{bar}$  and Rubisco contents in normal and yellowish rice leaves.  $P_{max}$  was calculated from Thornley's equation. Measurements were made at leaf temperature of 25°C with an open IRGA gas-exchanges system. Symbols are the same as in Fig. 4.

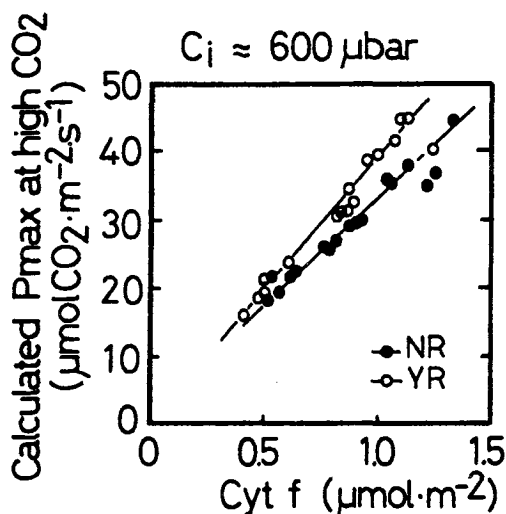


Fig. 7. Relationship between the maximum rate of photosynthesis ( $P_{max}$ ) at  $C_i \approx 600 \mu\text{bar}$  and Cyt f contents in normal and yellowish rice leaves.  $P_{max}$  was calculated from Thornley's equation. Measurements were made at leaf temperature of 25°C with an open IRGA gas-exchanges system. Symbols are the same as in Fig. 4.

## 結 論

本研究では、イネ黄色変異種と正常な一般栽培種を用い、光飽和、高CO<sub>2</sub>濃度条件下での光合成速度の律速因子について解析した。そして、その因子がRuBPの再生産に関わる因子であることに注目し、その中で、数多くの研究者によって重要視された電子伝達反応を構成する因子の一つであるCyt f に着目した。その結果、

①Thornleyの式を用いて算出された最大酸素発生速度の解析から、Cyt f 量が電子伝達活性の律速因子に成り得ることを確認した。

②しかし、光飽和、高CO<sub>2</sub>濃度条件下での光合成速度の律速因子は、Cyt f の量ではないことが明らかとなった。このことは、それが電子伝達活性そのものにも律速されないことを意味した。

以上のことから、高CO<sub>2</sub>濃度条件下での光合成は、電子伝達能力以外の因子に律速されていることが明らかとなり、その律速因子は、Rubisco量と常に同一の比率で存在するものであることが示された。

本研究では、光合成を葉緑体内の循環系の反応としてとらえ、RuBPの再生産速度とCyt f 量との関係に的を絞って研究を行ってきた。光合成の最終産物はstarchとsucroseである。とりわけsucroseは光合成の最も重要な最終産物であり、葉緑体内の代謝産物の一つであるTriose-phosphateから細胞質で合成される (Fig. 8)。したがって、最終産物の合成に関連した代謝産物の細胞質への輸送や、その蓄積に関連した因子もまた光合成能力に深く関与すると考えられる。今後は、光合成を葉緑体内だけの循環系の代謝としてその律速因子を解析するだけでなく、特に細胞質との関連代謝を含めた律速因子の解明が必要である。

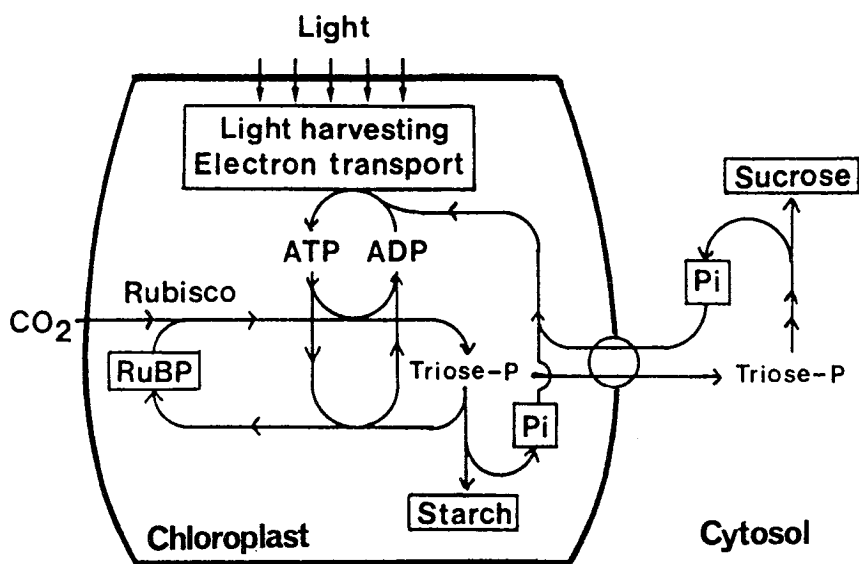


Fig. 8. Simplified Photosynthetic Mechanisms in  $C_3$  species

## 補 章

1 RuBPカルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ(Rubisco) は、カルボキシラーゼ活性およびオキシゲナーゼ活性を同時に有する酵素である。したがって、葉内 $CO_2$ 濃度下でのRubisco 活性は、以下の式から算出した。

生体内RuBPカルボキシラーゼ活性を求める式、 $V_c$ は次の通りである。

$$V_c = V_{c \max} * [CO_2] / \{ [CO_2] + K_m(CO_2) * [1 + [O_2] / K_m(O_2)] \} \quad (1)$$

ここで、 $V_{c \max}$ はカルボキシラーゼ $V_{max}$ 、 $[CO_2]$ は気孔伝導度から算出した葉内 $CO_2$ 濃度、そして $[O_2]$ は測定空気濃度を示す。酸素の $CO_2$ に対する拮抗阻害 $K_i$ 値は、 $K_m(O_2)$ に等しいと仮定した。

同様に、生体内RuBPオキシゲナーゼ活性を求める式、 $V_o$ は次の通りである。

$$V_o = V_{o \max} * [O_2] / \{ [O_2] + K_m(O_2) * [1 + [CO_2] / K_m(CO_2)] \} \quad (2)$$

ここで、 $V_{o \max}$ はオキシゲナーゼ $V_{max}$ 、を示す。

光呼吸の経路において、RuBPオキシゲナーゼによって1分子の $O_2$ が取り込まれた場合、ミトコンドリアのグリシン脱炭酸反応によって、0.5分子の $CO_2$ が放出される。したがって、RuBPカルボキシラーゼ/オキシゲナーゼによって触媒される正味の $CO_2$ 固定速度 (Rubisco 活性)、 $V_c/o$ は、式(1)と(2)から

$$V_t c/o = E * (V_c - 0.5 * V_o) \quad (3)$$

によって表せる。Eは、Rubisco 酵素量を示す。

また、イネ葉におけるRubisco のkinetic parametersは、Makino らにより報告された値を用いた。

Rubisco kinetics from Rice (at 25°C)

$$V_c \text{ max} = 1.77 \mu\text{mol/mg/min}$$

$$K_m(CO_2) = 8.0 \mu\text{M} (235 \mu\text{bar})$$

$$V_o \text{ max} = 0.58 \mu\text{mol/mg/min}$$

$$K_m(O_2) = 335 \mu\text{M} (27.8 \text{ mbar})$$

Makino *et al.* (1988) *Planta* 174, 30-38

II 光強度に対する光合成速度のレスポンスカーブからの最大光合成速度の算出には、以下の式を用いた。

この式は、光強度に対する光合成速度のレスポンスカーブを、Thornleyによりモデル化されたものであり、以下に示す5つのパラメーターから成っている。

(Thornley. (1976) *Mathematical Models in Plant Physiology*, pp 92-110.)

Thornley's equation (1976)

$$\theta * P^2 - (\phi * I + P_{\text{max}}) * P + \phi * I * P_{\text{max}} = 0$$

I = irradiance

P = photosynthetic rate

$\theta$  = convexity index ( $0 < \theta < 1$ )

$\phi$  = quantum yield for  $CO_2$  fixation

$P_{\text{max}}$  = photosynthetic rate at light saturation

I は光強度、P は光合成速度、 $P_{\max}$  は最大光合成速度を示す。また、 $\phi$  は光レスポンスカーブの初期勾配で、 $\theta$  は初期勾配から光飽和に達するカーブの曲率を示している。ここで実際測定できるのは、I、P であるため、まず測定可能な光強度 (I)  $1800 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  までの光合成速度 (P) を測定し、得られたレスポンスカーブから初期勾配 ( $\phi$ ) を定めた。次に、この得られたデータを Thornley の式に代入し、非直線双曲線近似プログラムソフト (任意の  $P_{\max}$  と  $\theta$  の組合せで作った双曲線と実際のデータの点の差を計算し、最も差が小さくなる  $P_{\max}$  と  $\theta$  を算出するプログラム) を用いて、 $P_{\max}$  を算出した。

## 本研究に関連して発表した論文

Hidema, J., A. Makino, T. Mae and K. Ojima (1991) Photosynthetic characteristics of rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. Plant Physiol. 97: 1287-1293

Hidema, J., A. Makino, Y. Kurita, T. Mae and K. Ojima (1992) Changes in the levels of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll protein of PSII in rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. Plant Cell Physiol. 33(8): 1209-1214

Makino, A., H. Sakashita, J. Hidema, T. Mae, K. Ojima and B. Osmond (1992) Distinctive responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and carbonic anhydrase in wheat leaves to nitrogen nutrition and their possible relationships to CO<sub>2</sub>-transfer resistance. Plant Physiol. in press

## 審査結果の要旨

近年、葉の光合成の律速因子に関する研究が進み、イネ、コムギ等の  $C_3$  型光合成を行う葉では、 $CO_2$  固定酵素である Rubisco の量が、光飽和、普通大気条件下 ( $CO_2$ :  $350 \mu bar$ ) での律速因子であることが明らかにされている。しかし、高  $CO_2$  濃度下での光合成の律速因子が何であるかについては分かっておらず、その解明は光合成の基礎研究として重要であるだけでなく、近年の地球をとりまく大気  $CO_2$  濃度の急上昇の問題とも関連して社会的にも重要課題となっている。

本論文は、主要穀物であるイネを材料に、光飽和、高  $CO_2$  濃度条件下における葉の光合成の律速因子について研究したものである。近年の  $C_3$  型光合成の生化学モデルによれば、 $C_3$  型光合成は、Rubisco の機能を中心に考えると、 $CO_2$  の固定能力ともう一方の基質である RuBP の再生産能力から成り立っているとみることが出来る。本論文では光飽和、高  $CO_2$  濃度下の光合成の律速因子が RuBP の再生産に関与する因子にあると予想し、特に電子伝達活性を支配と言われていた Cyt f 含量と電子伝達活性、電子伝達活性と光飽和高  $CO_2$  濃度下での  $CO_2$  固定速度等の関係に注目し、解析を行った。解析に当たっては、普通栽培種と黄色変異種のイネを用いて行った。黄色変異種を用いたのは Cyt f 含量が特に低いことが分かったからである。その結果、Cyt f 含量は電子伝達活性の律速因子であることが分かった。しかし、Cyt f 当たりでみた光飽和、高  $CO_2$  濃度下での最大光合成速度は、その含量が低い黄色種の方が普通種より高いという結果となり、Cyt f が直接の律速因子となっていないことが明らかになった。このことは、同時に電子伝達能力もその律速因子とはなっていないことを示していた。

以上、本論文で得られた結果は、光飽和、高  $CO_2$  濃度下での光合成の律速因子が Cyt f 以外にあることを明らかにしたものであり、この分野での今後の研究の方向を明確化したものとして光合成の生理において有用な知見をもたらしたと評価される。よって審査員一同は本研究者が博士（農学）の学位を授与するに値するものと認定した。